※※2008年11月改訂
※2008年４月改訂

産業分野用検査キット

大腸菌O157抗原キット

バイダス アッセイキット *E.coli* O157

VIDAS *E. coli* O157 (ECO)

30112

本品は、説明書をよく読んでから使用して下さい。

本品は、反応に必要な各種試薬を封入した試薬ストリップと抗*E.coli* O157抗体を内壁にコーティングしたスパーよりなっており、蛍光基質を用いた酵素免疫測定法により、自動免疫蛍光測定装置バイダスまたはミニバイダスで食品中に存在する*Escherichia coli* O157抗原を検出するキットです。

■形状・構造等（キット構成）

①ECO試薬ストリップ……………………………………… 30本
②ECOスパー（固相）……………………………………… 30本
③ECO陽性コントロールC1……………………………… 6 mL×１本
④ECO陰性コントロールC2……………………………… 6 mL×１本
⑤ECOスタンダードS1……………………………………… 6 mL×１本

各構成試薬の内容

①ECO試薬ストリップは、10個のウエルを有しています。ウエルの内容は、下記のとおりです。

ウエル	内　　　容
1	サンプル用ウエル (500μL)
2	予洗液　：トリス－Tween緩衝食塩液 (400μL)
3･4･5･7･8･9	洗浄液　：トリス－Tween 緩衝食塩液 (600μL)
6	標識抗体：アルカリフォスファターゼ標識抗*E.coli* O157ポリクローナル抗体 (400μL)
10	蛍光基質：４－メチルウンベリフェリルリン酸 (300μL)

②ECOスパー（固相）は、その内壁に抗*E.coli* O157抗体がコーティングされています。

③ECO陽性コントロールC1は、不活化*E.coli* O157抗原含有トリス－Tween緩衝食塩液です。

④ECO陰性コントロールC2は、トリス－Tween緩衝食塩液です。

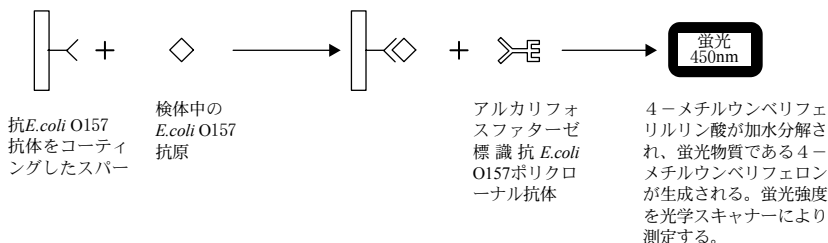
⑤ECOスタンダードS1は、不活化*E.coli* O157抗原含有トリス－Tween緩衝食塩液です。

＊本品を使用する際に他に必要な器具は、ボルテックスミキサー、500μL用及び1000μL用のピペット及び100℃用のウォーターバス又はそれに相当するもの等です。

■使用目的

食品中に存在する*Escherichia coli* O157抗原の検出

■測定原理

本品は蛍光基質を用いた酵素免疫測定法であるELFA（Enzyme Linked Fluorescent Assay）法を採用し、サンドイッチ法を測定原理としています。検体がピペットチップ様のスパー内へ吸引されたとき、スパー内に固相化されている抗*E.coli* O157抗体に検体中の*Escherichia coli* O157抗原が結合します。これにアルカリフォスファターゼ標識抗*E.coli* O157ポリクローナル抗体が結合し、ついで蛍光基質４－メチルウンベリフェリルリン酸がスパー内に吸引され、アルカリフォスファターゼにより、蛍光物質である４－メチルウンベリフェロンに加水分解されます。370nmの励起光を照射して得られる450nmの蛍光強度を測定することにより、検体中の*Escherichia coli* O157抗原を検出します。分析から結果のプリントアウトまで自動免疫蛍光測定装置バイダスまたはミニバイダスにより自動的に行われます。

■特　　長

1．試料を直接１番目のウエルに注入するだけでめんどうなピペット操作を必要としません。
2．ピペットチップ様のECOスパーおよび必要な試薬をあらかじめ封入したECO試薬ストリップの組合わせで測定しますので、検体および試薬間の汚染の心配がありません。
3．自動免疫蛍光測定装置バイダスまたはミニバイダスにより、自動的に分析から結果のプリントアウトまで行われます。

■MLEカードによるマスターロットデータの入力およびキャリブレーション補正

新しいロットを使用する際には、バイダスまたはミニバイダスユーザーズマニュアルの指示に従って、本品に含まれるMLEカードのマスターロットデータを入力して下さい。またECOスタンダードS1を用いて、ロットごとおよび14日ごとに二重測定により、キャリブレーション補正を実施して下さい。

■精度管理

新しいキットを使用する際及びキャリブレーション補正を実施する度に本品に含まれるECO陽性コントロールC1及びECO陰性コントロールC2を用いて、精度管理を行って下さい。そして測定値が規格値内であることを確認して下さい。

■操作上の注意

１．試料の前処理または試料の保存状態が不適切なときは、誤った結果が得られることがあります。

２．本品で測定する前に、必ず増菌培養液を100℃のウォーターバスで15分間、加熱して下さい。

３．本品および試料の取り扱いは、生物学的安全性の見地から充分に注意して下さい。

４．パウダーが付着した手袋を使用すると、誤った結果の原因になることがあるので、本品の取り扱いには、パウダーフリーの手袋を使用して下さい。

５．本品は、ヒト検体および動物検体には使用しないで下さい。

６．本品は、「用法・用量（操作方法）」欄に記載された方法に従って使用して下さい。記載された「用法・用量（操作方法）」および「使用目的」以外に用いられた場合、誤った結果が得られることがあります。

■用法・用量（操作方法）

１．検体の前処理

(1) AFNOR承認法（N°BIO-12/8-07/00）：

本法は、standard EN ISO16140に従ってstandard ISO16654の方法と比較検証されています。

前増菌培地は、予め41±１℃に加温しておきます。

1) 無菌的に食品検体25g（又は25mL）をストマッカー袋に取り、検体が乳製品の場合はアクリフラビン添加m-TSBを、それ以外の場合はノボビオシン添加m-TSBを、それぞれ225mL加えます。

2) ストマッキング後41±１℃で６－７時間、前増菌培養します。

3) 前増菌培養液１mLをセフィキシムおよび亜テルル酸カリウム添加マッコンキー液体培地（CT-MAC培地）９mLに加えます。35－37℃で18±１時間、増菌培養します。

4) 培養後、増菌培養液をよく混和し１mLを密封試験管に移します。ウォーターバスを用い95－100℃で15±１分加熱後、冷ましてからバイダスを用い測定します。残りの増菌培養液は２－８℃で保管します（陽性の際の確認試験用）。

注意：未加熱の増菌培養液はバイダスで測定するまで２－８℃で24時間まで保管可能です。確認試験は、CT-MAC培地の培養終了後48時間以内に行って下さい。

(2) AOAC RI承認法（N°010502）牛挽肉専用プロトコル：

前増菌培地は、予め42±１℃に加温しておきます。

①．*８時間プロトコル*：検体25gにm-TSB（ノボビオシン非添加）225mLを加えます。２分間ストマッキング後42±１℃で８時間培養します。

②．*24時間プロトコル*：検体25gに、最終濃度20mg/Lのノボビオシンを添加したm-TSBを225mL加えます。２分間ストマッキング後42±１℃で６－８時間培養します。培養後、培養液１mLをCT-MAC培地（セフィキシムおよび亜テルル酸カリウム添加マッコンキー液体培地）９mLに加え、35±１℃で18－24時間培養します。

培養後、増菌培養液をよく混和し1mLを密封試験管に移します。ウォーターバスを用い95－100℃で15±１分加熱後、冷ましてからバイダスを用い測定します。残りの増菌培養液は２－８℃で保管します（陽性の際の確認試験用）。

２．試薬の調製方法

構成試薬は、すべてそのまま使用して下さい。

３．操作方法

(1) 本品を冷蔵庫から出して、必要な本数のECO試薬ストリップ、ECOスパーおよびその他必要な構成試薬のみを取り出し、試験室内に約30分間放置して下さい。残りは、冷蔵庫に戻して下さい。

(2) バイダスまたはミニバイダスユーザーズマニュアルの指示に従って、検体番号およびアッセイコード（ECO）を入力し、ワークリストを作成して下さい。

(3) 試料をボルテックスミキサーで充分に攪拌して下さい。

(4) 各ECO試薬ストリップのサンプル用ウエルの真中に検体、ECOスタンダード、ECO陽性コントロールC1及びECO陰性コントロールC2を、それぞれ正確に500μL入れて下さい。

(5) ワークリストで指示された位置にECO試薬ストリップおよびECOスパーをセットして下さい。試薬ストリップとスパーの組み合わせを確認して下さい。

(6) バイダスまたはミニバイダスユーザーズマニュアルの指示に従って、測定を開始して下さい。

(7) 測定は約45分で終了し、判定結果及び測定値が相対蛍光強度（RFV）とともにプリントアウトされます。測定値は、ECOスタンダードS1のRFVに対する検体のRFVの比であらわされます。RFVは、機器が読み取った蛍光の強さから計算される値です。機器は、ECO試薬ストリップの光学キュベット部分の蛍光の強さを２回、反応前（バックグラウンド）と反応後に読み取ります。２回目の値から１回目の値を引いたものをRFVとしています。

■本品に用いられる培地の調製方法

１．Modifiedトリプケースソイ液体培地（m-TSB）

AFNOR承認

standard NF EN ISO16654に準拠（ノボビオシン以外の基礎培地）

１L当たり

- トリプケースソイ粉末培地　30.0g
- 無水リン酸水素ニカリウム　1.5g
- 胆汁酸塩（No.3）　1.5g

オートクレーブを用い、121℃で15分間加熱します。

－乳製品に用いる場合は、ろ過滅菌した2mLの5mg/mL塩酸アクリフラビンを冷ました培地１Lに加えます（最終濃度10mg/L）。

－他の食品に用いる場合は、ろ過滅菌した１mLの20mg/mLノボビオシンを冷ました培地１Lに加えます（最終濃度20mg/L）。

AOAC承認

１L当たり

- トリプケースソイ粉末培地　30.0g

●胆汁酸塩（No.3）　1.5g
●無水リン酸水素ニナトリウム　1.25g
●カサミノ酸　10.0g

オートクレーブを用い、121℃で15分間加熱します。

－24時間プロトコル：ろ過滅菌した１mLの20mg/mLノボビオシンを冷ました培地１Lに加えます（最終濃度20mg/L）。

２．セフィキシムおよび亜テルル酸カリウム添加マッコンキー液体培地（CT-MAC培地）

－マッコンキーブイヨン（品番51015）を、取扱説明書に従って調製します。

－オートクレーブを用い、121℃で15分間加熱します。

－CTサプリメント（品番42606）１ボトルをマッコンキーブイヨン200mLに、またはCTサプリメント180μlをマッコンキーブイヨン９mlに加えます（セフィキシム最終濃度0.05mg/L、亜テルル酸最終濃度2.5mg/L）。

－培地による非特異反応を避けるため、マッコンキーブイヨン（品番51015、ビオメリュー）をご使用下さい。本培地は特に本試験に適しています。

３．セフィキシム及び亜テルル酸カリウム添加マッコンキーソルビトール培地（CT-SMAC培地）

－マッコンキーソルビトール液体培地（SMAC培地）を説明書に従って調製します。

－121℃、15分間、オートクレーブします。その後、45－50℃に冷まします。

－培地１Lに亜テルル酸カリウム2.5mgを、つまり培地１Lに１％亜テルル酸カリウム水溶液（品番55501）250μLを加えます。また培地１Lにろ過滅菌した50μgのセフィキシムを、つまり50mg/Lのセフィキシム溶液１mLを加えます。

４．50mg/Lのセフィキシム溶液の調製

100mmol/L重炭酸ナトリウム溶液（pH8.0）100mLに５mgのセフィキシムを溶解し、ろ過滅菌します。２－８℃で保存します。

■測定結果の判定法

測定値	結果の判定
＜0.10	陰性
≧0.10	陽性

測定結果が＜0.1の場合は、試料中の抗原が検出限界以下であることを示しています。測定結果が≧0.1の場合は、陽性として報告されます。そして、陽性の場合は確認試験を行います。

〈陽性結果の確認試験〉

（1）AFNOR承認法（N°BIO-12/8-07/00）：

２－８℃に保管しておいた未加熱の増菌培養液（CT-MAC培地）を用い、以下のいずれかの方法を実施します。

①．CTサプリメント添加O157:H7ID寒天培地またはCT-SMAC寒天培地に接種し、37±１℃で18－24時間培養します。

②．バイダスICE O157確認用キットで集菌した後、O157:H7ID寒天培地（CTサプリメント非添加）またはCT-SMAC寒天培地に接種し、37±１℃で18－24時間培養します。

特徴的なコロニー１－５個を、CEN、ISOまたはAFNORで標準化された方法（単離を含む）に従い同定します。選択寒天培地上で分離されたコロニーを直接アピに用いることも可能です。

選択寒天培地培養後に特徴的なコロニーが得られなかった場合は、別の選択寒天培地に接種し再確認することをお勧めします。

結果が矛盾する場合（バイダスで陽性だったにもかかわらずCEN、ISOまたはAFNORで標準化された方法で確認できなかった場合）は、再確認を行う必要があります。実施した方法（上記①または②）と異なる方法で再度確認試験を行って下さい*。

＊バイダスECOで陽性にもかかわらず選択寒天培地で特徴的なコロニーがみられない場合、検体中にH7以外のO157が存在していた可能性があります。

(2) AOAC RI承認法（N°010502）牛挽肉専用プロトコル：

陽性検体をCT-SMAC寒天培地またはCTサプリメント添加O157:H7ID寒天培地に画線塗抹します。

特徴的なコロニーはUSDA法（http://www.fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/Mlg5.03.pdf）で確認して下さい。

■測定範囲

本品は運動性および非運動性の*E.coli* O157を検出することができます。

■交差反応

サルモネラN血清群及びある種のシトロバクターと交差反応を示すことがあります。

■使用上または取り扱い上の注意

１．一般的注意

(1) 本品は凍結を避け、２～８℃で貯蔵して下さい。

(2) 試薬が誤って皮膚に付いたり、目や口に入った場合は、水で充分に洗い流して下さい。必要に応じて医師の手当を受けて下さい。

(3) キットを開封したときに、スパーのパッケージが密封されており、破損がないことを確認して下さい。密封されていなかったり、破損していた場合には、スパーを使用しないで下さい。使用後はスパーの安定性を保つために乾燥剤が入ったパッケージをしっかり密閉して下さい。そしてキットを２－８℃に保存して下さい。

(4) 異なるロットの構成試薬を混合して使用しないで下さい。

(5) キット中の容器、付属品等は、他の目的に転用しないで下さい。

(6) 使用期限を過ぎた製品は、使用しないで下さい。

(7) バイダスまたはミニバイダスは定期的に洗浄して下さい。

２．操作上の注意

(1) 口でのピペット操作はしないで下さい。

(2) 試薬がこぼれたり、もれたりした場合は、0.5％次亜塩素酸ナトリウム溶液等できれいに拭き取って下さい。

３．廃棄

(1) 本品の構成試薬中のECO試薬ストリップ、ECO陽性コントロールC1、ECO陰性コントロールC2およびECOスタンダードS1は、0.1％アジ化ナトリウムを含有しており、鉛または銅と反応して、爆発性の金属アジ化合物を生成する可能性がありますので、下水道に廃棄する際は、大量の水を流して下さい。

(2) 使用済みの試料、試薬、器具等は必ずオートクレーブで滅菌、焼却または消毒液に浸してから廃棄して下さい。

注）0.5％次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理したものはオートクレーブで滅菌しないで下さい。

■貯蔵方法・使用期限

２～８℃で保存して下さい（禁凍結）。

使用期限は、パッケージの⌛マークに記載してあります。

■包装単位

バイダス　アッセイキット　*E.coli* O157 ………………… 30回用

■主要文献

１．HOCKIN J., LIOR H. Hemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157 : H7 in Canada. Can. Dis. Weekly Rep. Health Welfare Can., 1987, 13, 203-204.

２．PUDDEN D., TUTTLE N., KORN D., CARLSON J., CARTER A., HOCKIN J. Hemorrhagic colitis in a nursing home-Ontario. Can. Dis. Weekly Rep., 1985, 11, 169-170.

３．KNIGHT P. Hemorrhagic *E. coli* : the danger increases. ASM news, 1993, 59, 5.

４．FIELDS P.I., BLOM K., HUGUES H.J., HELSEL L.O., FENG P., SWAMINATHAN B. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* 0157:H7 and O157:NM. J. Clinical microbiol., 1997, 1066-1070.

５．EN ISO 16140 - 2003 – Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.

６．NF EN ISO 16654 - V08032 – Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.

７．Detection, Isolation, and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM (Nonmotile) from Meat Products.
http://www.fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/Mlg5.03.pdf.

８．PADHYE N.V., DOYLE M.P. Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *E. coli* 0157:H7 in food. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57, 2693-2698.

※■問い合わせ先

※※シスメックス株式会社　科学計測事業部

〒141-0032　東京都品川区大崎一丁目２番２号　大崎セントラルタワー８階

TEL 0120－022－328

シスメックス・ビオメリュー株式会社

※※〒141-0032　東京都品川区大崎一丁目２番２号　大崎セントラルタワー８階

TEL 03－6834－2666（代表）

※■製造販売業者の氏名または名称及び住所

シスメックス・ビオメリュー株式会社

※※〒141-0032　東京都品川区大崎一丁目２番２号　大崎セントラルタワー８階